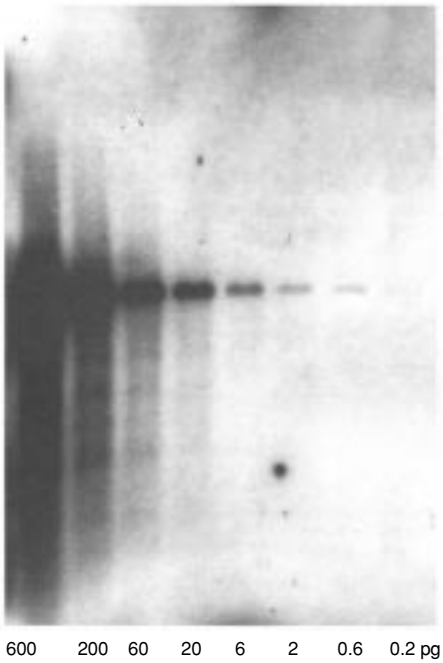

図14. ノーザンブロット上におけるDIGラベルされたプローブ感度の評価. 様々な量(600～0.2 pg)の，精製済みシングルコピー遺伝子由来のラベルされていないセンスRNA転写産物をMOPS-フォルムアルデヒドゲル分離し，ノーザンブロッティングによりナイロンメンブレンへトランスファーした．標準的なハイブリダイゼーション反応(本章のセクション3.2に解説される)により，DIGラベルされたハイブリダイゼーションプローブ(同じ遺伝子からの相補的アンチセンスRNA転写産物)の感度の決定を行った．
実験条件： DIG Easy Hyb 1 ml当たり100 ngのプローブを用いて65℃，オーバーナイトでハイブリダイゼーションを行った後，ストリンジェント洗浄を行った．ハイブリッドは，CSPD化学発光基質を用いて可視化された．この化学発光アッセイをX-線フィルムへ35分間露光させた(M. Block, University of Hamburg, Germanyの協力によるデータ)．
結論：ラベルされたプローブにより，0.2 pgのターゲットRNA(右端のレーン)の検出が可能である．

2. 4 オリゴヌクレオチドのDIGラベリング

in situ ハイブリダイゼーションなど，アプリケーションによってはDIGラベルされた合成オリゴヌクレオチドが最良のハイブリダイゼーションプローブとなる場合があります．*in situ* ハイブリダイゼーションの他にも，DIGラベルされたオリゴヌクレオチドを以下のアプリケーションに使用することが可能です：

- ハイブリダイゼーションプローブとして
  - ドットまたはスロットブロット
  - ライブラリーのスクリーニング
  - 遺伝子の反復シークェンスのサザンブロット上での検出

ノート：オリゴヌクレオチドプローブは，ブロット上に十分量のターゲットDNAが存在する場合(例えば，10 μgのヒトゲノムDNAなど)，複雑なゲノム中においてシングルコピー遺伝子を検出するのに十分な感度を有します．

- ノーザンブロット上に豊富に存在するmRNAの検出

オリゴヌクレオチドをDIGラベルするにはいくつかの方法があります.これらを次の表にまとめます.

ハイブリダイゼーション用プローブのDIGラベリングに関するテクニック

RNAまたはDNAにDIGを直接付加させる方法

オリゴヌクレオチドをDIGラベリングするための方法

実験方法[1, 2]（弊社の主要製品）	オリゴヌクレオチド[3]の必要量	ラベリングの温度と時間	ラベルされたプローブの検出感度	この方法の利点
DIG-ddUTPを用いた3'末端のラベリング（DIG Oligonucleotide 3' End Labeling Kit, 2nd generation Cat. No.3 353 575）	100 pmol	37℃, 15分間	10 pg DNA	● 必要となるテンプレートがほんの少量です. ●ラベルされたプローブは精製せずに使用可能です. ●反応を無制限にスケールアップすることが可能です（インキュベーション時間を 1 時間に延長した場合）.
DIG-dUTPとdATPのテールを3'末端に付加（約40～50残基）（DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd generation Cat. No.3 353 583）	100 pmol	37℃, 15分間	1 pg DNA	●必要となるテンプレートがほんの少量です. ●末端ラベルよりも感度の高いプローブを生成します. ●ラベルされたプローブは精製せずに使用可能です. ●反応を無制限にスケールアップすることが可能です.

1 これらオリゴヌクレオチドのラベリング法は全て，ライブラリーのスクリーニング，ドット/スロットブロット，*in situ* のアッセイに適したプローブを生成します.また, サザンブロット上のDNAシークェンスまたはノーザンブロット上の発現量の多いmRNAシークェンスの検出も使用することができます.

2 これらのラベリング反応の操作は，いずれもシンプルです．ラベリング反応の詳細については，適宜 Roche社製品の取扱説明書を参照ください（ウェブサイトからご覧頂けます．http://www.roche-applied-science.com）.

3 オリゴヌクレオチドの精製は重要です．オリゴヌクレオチドをラベリングする前に，必ずHPLCにより精製してください.